

## Perbandingan ekspresi p53, Bcl-2, dan indeks apoptosis trofoblas pada preeklampsia/eklampsia dan kehamilan normal

K. KEMAN  
N. PRASETYORINI  
M.J. LANGGAR

*Divisi Fetomaternal Lab/SMF Obstetri Ginekologi  
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya/  
RSU Dr. Saiful Anwar  
Malang*

**Tujuan:** Membuktikan bahwa, jumlah sel trofoblas yang mengalami apoptosis pada sampel jaringan trofoblas yang berasal dari kehamilan dengan preeklampsia/eklampsia lebih tinggi apabila dibandingkan dengan kehamilan normal.

**Tempat:** Bagian Obstetri dan Ginekologi RSU Dr. Saiful Anwar Malang, dan Lab Biomedik FKUB Malang.

**Bahan dan cara kerja:** Penelitian ini merupakan studi laboratorium secara potong lintang; dengan teknik imunohistokimia untuk pengamatan ekspresi protein Bcl-2 dan p53, dan teknik DNA-terfragmentasi (TUNEL) untuk menghitung indeks apoptosis. Sampel jaringan trofoblas berasal dari biopsi jaringan plasenta preeklampsia/eklampsia, dibandingkan dengan persalinan normal ( $n = 20$ ). Variabel bebas: p53, Bcl-2, apoptosis. Variabel tergantung: preeklampsia/eklampsia. Analisa statistik menggunakan *Independent t test* ( $p \leq 0,05$ ).

**Hasil:** Terdapat perbedaan yang signifikan jumlah sel-sel trofoblas yang mengalami apoptosis pada kelompok kehamilan normal ( $4,70 \pm 1,829$ ), dibandingkan dengan kelompok preeklampsia/eklampsia ( $4,70 \pm 1,829$ ), (*t test*;  $p \leq 0,000$ ). Terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi protein Bcl-2 pada jaringan trofoblas kelompok kehamilan normal ( $20,30 \pm 5,774$ ), dibandingkan kelompok preeklampsia/eklampsia ( $9,90 \pm 1,912$ ) (*t test*;  $p \leq 0,000$ ). Terdapat perbedaan yang bermakna ekspresi protein p53 pada jaringan trofoblas kelompok kehamilan normal ( $8,20 \pm 2,898$ ), dibandingkan dengan kelompok preeklampsia/preeklampsia ( $22,70 \pm 4,990$ ) (*t test*;  $p \leq 0,000$ ).

**Kesimpulan:** Jumlah sel trofoblas yang mengalami apoptosis pada jaringan trofoblas preeklampsia/eklampsia lebih tinggi daripada kehamilan normal.

[Maj Obstet Ginekol Indones 2009; 33-3: 151-9]

**Kata kunci:** trofoblas, indeks apoptosis, p53, Bcl-2, preeklampsia, eklampsia

**Objective:** To prove that amount of apoptotic trophoblast cells on trophoblast tissue sample from preeclamptic/eclamptic complicated pregnancy, were higher then normal pregnancy.

**Setting:** Department of Obstetri and Gynecology General Hospital Dr. Saiful Anwar Malang, and Laboratory of Biomedic Medical Faculty of Brawijaya University Malang.

**Material and method:** Laboratory cross sectional study, that observe immuno-histochemically, p53 and BCL-2 protein expression; also the DNA-fragmented technically (TUNEL) to detect apoptotic cells on trophoblastic tissue. Sample of trophoblastic tissue was performed from biopsy of placental tissue of preeclamptic/eclamptic complicated pregnancy, compare by the normal pregnancy ( $n = 20$ ). Independent variable: p53, Bcl-2, apoptosis. Dependent variable: preeclamptic/eclamptic. Statistic analysis: *Independent t test* ( $p = 0.05$ ).

**Result:** There are significant different amount of trophoblast cells that were apoptotic on trophoblast tissue of preeclamptic/eclamptic group ( $4.70 \pm 1.829$ ), compare by normal pregnancy group ( $15.30 \pm 3.561$ ). (*t test*;  $p \leq 0.000$ ). There are significant different of Bcl-2 protein expression on trophoblast tissue of normal pregnancy, ( $20.30 \pm 5.7744$ ), compare by preeclamptic/eclamptic group (rerata  $9.90 \pm 1.9124$ ). (*t test*;  $p \leq 0.000$ ). There are significant different of p53 protein expression on trophoblast tissue of normal pregnancy ( $8.20 \pm 2.898$ ), compare by preeclamptic/eclamptic group ( $22.70 \pm 4.990$ ). (*t test*;  $p \leq 0.000$ ).

**Conclusion:** The amount of trophoblast cells that were apoptotic on trophoblast tissue of preeclamptic/eclamptic complicated pregnancy, were higher then normal pregnancy.

[Indones J Obstet Gynecol 2009; 33-3: 151-9]

**Keywords:** trophoblast, apoptotic index, p53, Bcl-2, preeclamptic, eclamptic

### PENDAHULUAN

Preeklampsia terjadi pada 5-7% kehamilan dan menjadi penyebab utama mortalitas dan morbiditas pada maternal. Frekuensi preeklampsia/eklampsia tiap negara berbeda. Di Indonesia dilaporkan berkisar 3-10%. Di RSU Dr. Saiful Anwar tahun 2006 terdapat sekitar 321 kasus preeklampsia dan 72 kasus eklampsia dari 2588 persalinan.<sup>1-3</sup>

Preeklampsia/eklampsia sampai saat ini masih merupakan *disease of theory*. Berbagai macam penelitian belum dapat menerangkan dengan jelas penyebab pasti preeklampsia/eklampsia. Akibatnya, sampai saat ini belum ada pengobatan definitif pada kelainan ini.<sup>2,4</sup> Banyak teori telah dikemukakan tentang terjadinya hipertensi dalam kehamilan, namun tidak satupun teori tersebut yang dianggap mutlak benar. Menurut Sibai, teori yang banyak dianut ada-

lah: (1) teori kelainan vaskularisasi plasenta; (2) teori iskemia plasenta, radikal bebas dan disfungsi endotel; (3) teori intoleransi imunologik antara ibu dan janin; (4) teori adaptasi kardiovaskular; (5) teori defisiensi genetik; (6) teori defisiensi gizi; (7) teori inflamasi.<sup>1,4</sup>

Menurut teori iskemia plasenta, patogenesis pre-eklampsia terdapat hubungan antara iskemia plasenta dan disfungsi sel endotel. Kerusakan endotel sistemik tampak menjadi faktor utama gejala dan tanda dari preeklampsia. Salah satu teori yang dikemukakan oleh Redman dan Sargent<sup>5</sup> adalah kerusakan endotelial sistemik disebabkan oleh mikrodeposisi dari partikel membran mikrovili sinsitiotrofoblas. Peningkatan perpindahan sinsitiotrofoblas pada preeklampsia dapat disebabkan oleh apoptosis pada sinsitium, yang berefek pada integritas jaringan. Ditengarai apoptosis berperan penting pada proses pembaharuan sinsitium. Nukleus apoptotik ditemukan pada sekelompok sinsisial dan mungkin berperan pada proses pelepasan fragmen ke sirkulasi maternal. Proses ini berlangsung di sinsitium plasenta pada pasien preeklampsia. Smith (1997)<sup>6</sup>, Huppertz, (2000)<sup>7</sup>, Levi and Nelson (2000)<sup>8</sup> melaporkan apoptosis plasenta meningkat secara signifikan seiring dengan bertambahnya usia kehamilan. Insiden apoptosis yang lebih besar telah diobservasi dalam kehamilan dengan komplikasi preeklampsia dan IUGR (*Intra Uterine Growth Retardation*).<sup>6-8</sup> Peningkatan apoptosis yang dilaporkan terjadi pada preeklampsia berhubungan dengan mekanisme yang terkait dengan patogenesisnya, di mana apoptosis distimulasi oleh berkurangnya oksigenasi plasenta yang menyertai penyakit ini.<sup>1,9</sup>

Trofoblas yang terpapar hipoksia secara invitro menyebabkan ikatan apoptosis proses, yang berhubungan dengan peningkatan ekspresi protein p53 dan Bax, serta penurunan ekspresi anti apoptotic Bcl-2. Ikatan apoptosis dan regulasi ke atas dari p53 juga ditemukan di sampel plasenta yang diambil dari kehamilan dan komplikasi preeklampsia.<sup>1,5</sup> Basejour A. (2005)<sup>10</sup> melaporkan peningkatan indeks apoptosis (Bax/Bcl-2) pada plasenta tikus percobaan dengan preeklampsia. Di Federico (1999)<sup>11</sup> melaporkan pada kelompok kontrol dengan kondisi normal menunjukkan hampir tidak terjadi apoptosis tetapi pada kelompok wanita dengan preeklampsia, sekitar 15%-50% sitotrofoblas pada dinding uterusnya positif mengalami apoptosis. R. Austgulen (2003)<sup>9</sup> melaporkan peningkatan apoptosis pada sinsitiotrofoblas plasenta pada preeklampsia dengan bayi kecil usia kehamilan. Levy (2002)<sup>8,12</sup> melaporkan adanya ekspresi p53 yang meningkat pada plasenta dari kehamilan dengan komplikasi IUGR. Riawan W. (2004)<sup>13</sup> melaporkan terjadinya pening-

katan kejadian apoptosis dihubungkan dengan ekspresi p53 pada plasenta preeklampsia.

Beberapa penelitian mengenai preeklampsia dan apoptosis telah dilakukan untuk menggali patogenesis preeklampsia/eklampsia dari segi *marker* biokimia. Namun masih banyak kontroversi dalam hal ini. Oleh karena itu peneliti tertarik untuk membandingkan proses apoptosis pada plasenta preeklampsia/eklampsia dan plasenta kehamilan normal dengan mengukur indeks apoptosis dan melihat ekspresi p53 dan Bcl-2 pada sel trofoblas.

## METODE

Penelitian ini merupakan studi laboratorium secara potong lintang; dengan teknik imunohistokimia untuk pengamatan ekspresi protein Bcl-2 dan p53, dan teknik DNA-terfragmentasi (TUNEL) untuk menghitung indeks apoptosis. Sampel jaringan trofoblas berasal dari biopsi jaringan plasenta preeklampsia/eklampsia, dibandingkan dengan persalinan normal. (n = 20). Variabel bebas: p53, Bcl-2, apoptosis. Variabel tergantung: preeklampsia/eklampsia. Analisa statistik menggunakan *Independent t test* ( $p \leq 0,05$ ).

### Pembuatan slide jaringan

Jaringan trofoblas hasil biopsi difiksasi pada formalin 10%. Setelah itu dilakukan dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 96% dan absolut) masing-masing 60 menit. Dilakukan *Clearing* menggunakan xilol 2 kali masing-masing 60 menit. Kemudian dilakukan infiltrasi dengan parafin lunak selama 60 menit pada suhu 48°C. Kemudian dilakukan *block* dalam parafin keras pada cetakan dan didiamkan selama sehari. Keesokan harinya ditempelkan pada *holder* dan dilakukan pemotongan setebal 4-6  $\mu$ m dengan *rotary microtome*. Dilakukan *mounting* pada gelas objek dengan gelatin 5%. Gelas objek hasil *parafin block* direndam dalam xilol 2 kali masing-masing selama 5 menit. Setelah itu dilakukan rehidrasi menggunakan alkohol berseri (absolut, 96%, 80%, 70%, 50% dan 30%) masing-masing selama 5 menit. Kemudian dibilas dalam dH<sub>2</sub>O selama 5 menit.

### Imunohistokimia p53

*Slide* dicuci dengan PBS pH 7,4 satu kali selama 5 menit. *Blocking* endogenous peroksida menggunakan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 20 menit. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. *Blocking unspecific* protein menggunakan 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Inkubasi

menggunakan *rabbit* poliklonal anti p53 (*wild-type*), selama 60 menit. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Inkubasi menggunakan anti *rabbit HRP conjugated* selama 40 menit. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Tetesi dengan DAB (Diamino Benzidine) dan inkubasi selama 10 menit. Cuci menggunakan dH<sub>2</sub>O, selama 5 menit. *Counterstaining* menggunakan Mayer Hematoxilen yang diinkubasi selama 10 menit dan cuci menggunakan *tap water*. Bilas menggunakan dH<sub>2</sub>O dan kering anginkan. *Mounting* menggunakan entelan dan tutup dengan *cover glass*. Amati pada mikroskop cahaya. Ekspresi p53 ditunjukkan dengan warna coklat pada sitoplasma.

### Imunohistokimia Bcl-2

*Slide* dicuci dengan PBS pH 7,4 satu kali selama 5 menit. *Blocking endogenous* peroksida menggunakan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 20 menit. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. *Blocking unspecific* protein menggunakan 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Inkubasi menggunakan *rabbit* poliklonal anti Bcl-2, selama 60 menit. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Inkubasi menggunakan anti *rabbit HRP conjugated* selama 40 menit. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Tetesi dengan DAB (Diamino Benzidine) dan inkubasi selama 10 menit. Cuci menggunakan dH<sub>2</sub>O, selama 5 menit. *Counterstaining* menggunakan Mayer Hematoxilen yang diinkubasi selama 10 menit dan cuci menggunakan *tap water*. Bilas menggunakan dH<sub>2</sub>O dan keringanginkan. *Mounting* menggunakan entelan dan tutup dengan *cover glass*. Amati pada mikroskop cahaya. Ekspresi Bcl-2 ditunjukkan dengan warna coklat pada sitoplasma.

### Teknik DNA-terfragmentasi (TUNEL)

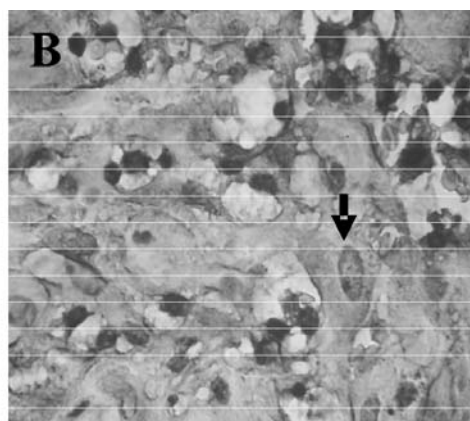
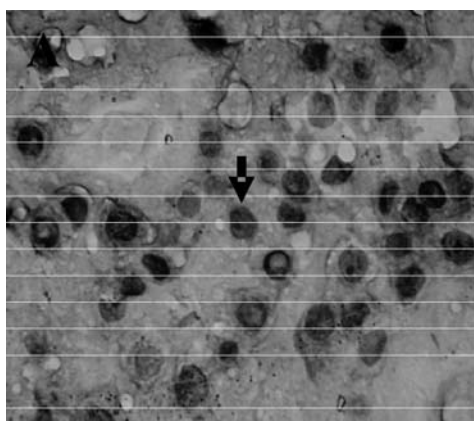
*Slide* dicuci menggunakan PBS pH 7,4 dan inku-

basi menggunakan 20 µg/ml proteinase-K selama 15 menit pada 37°C. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Inkubasi pada 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 15 menit dan selanjutnya cuci dengan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Inkubasi dengan *Tunel fragmented DNA labelling* selama 60 menit pada 37°C. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Inkubasi dengan Peroksidase solution selama 40 menit pada 37°C. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Tetesi menggunakan substrat untuk Peroksidase (DAB - Diamino Benzidine) selama 20 menit pada suhu ruang. Cuci dengan PBS pH 7,4 dan *Counterstain* dengan Mayer hematoxilen selama 10 menit, bilas dengan air kran dan cuci dengan dH<sub>2</sub>O keringkan dan tutup dengan *coverglass*. Kemudian amati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x, sel-sel apoptosis ditunjukkan dengan warna coklat pada inti sel.

## HASIL PENELITIAN

### Pengamatan sel apoptosis dengan teknik DNA-terfragmentasi (TUNEL)

Beberapa aspek apoptosis pada sel, dapat dikarakterisasi melalui morfologi seluler, yang bisa diamati dengan menggunakan mikroskop, meliputi *shrinkage*, migrasi kromatin dan membran blebing, kondensasi inti serta kemudian segmentasi dan pемisahan menjadi *apoptotic bodies* (yang akan mengalami fagositosis). Fragmentasi DNA yang terjadi pada proses apoptosis akan berlangsung selama beberapa jam, sebelum akhirnya akan mengalami fagositosis. Dengan menggunakan teknik pelabelan terhadap DNA terfragmentasi (TUNEL). (Gambar 1) Penghitungan sel menurut Soini, (1998) dan Pizem and Cor (2003) yang dimodifikasi<sup>4,13</sup> untuk



Gambar 1. Apoptosis sel-sel Trofoblas Jaringan Plasenta yang dipulas menggunakan TUNEL. Tampak bahwa sel-sel trofoblas yang mengalami apoptosis akan berwarna coklat pada inti sel (panah warna hitam).  
A. Plasenta Normal  
B. Plasenta Preeklampsia.

mengkuantifikasi indeks apoptosis jaringan trofoblas, diketahui bahwa terjadi peningkatan indeks apoptosis sel-sel trofoblas. Tampak bahwa, dengan menggunakan uji *T-Test*, menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan jumlah sel-sel trofoblas yang mengalami apoptosis pada kelompok kontrol (rerata  $4,70 \pm 1,829$ ) terhadap kelompok preeklampsia (rerata  $15,30 \pm 3,561$ ) dengan nilai  $p \leq 0,000$ . (Tabel 1)

Rerata hasil perhitungan apoptosis pada kelompok normal dan preeklampsia, menunjukkan perbedaan rerata jumlah sel-sel trofoblas yang mengalami apoptosis yang signifikan pada kelompok kontrol terhadap kelompok preeklampsia. Perbedaan notasi menunjukkan perbedaan yang signifikan, dengan nilai  $p \leq 0,000$ . (Tabel 1)

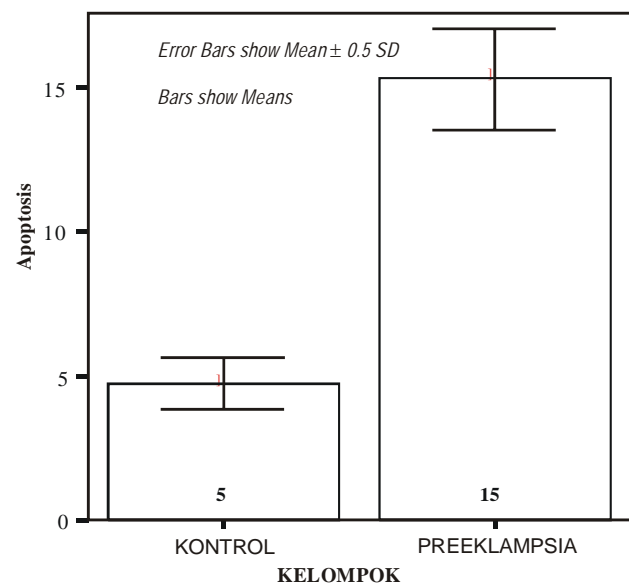
**Tabel 1.** Rerata hasil perhitungan apoptosis pada kelompok normal dan preeklampsia

Kelompok	Rerata	$\pm$ SD	Notasi
Normal	4,70	1,829	a
Preeklampsia	15,30	3,561	b

Hasil uji statistik dengan uji t menunjukkan bahwa, nilai signifikansi ( $p$ ) dari apoptosis (TUNEL) antara kelompok PEB dan kontrol sebesar 0,000 yang lebih kecil dari  $\alpha$  0,05, dengan nilai -t hitung (-8,374), sehingga tolak  $H_0$ . Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada apoptosis (TUNEL) dari kelompok PEB dan kelompok kontrol. Hal ini disebabkan oleh adanya perbedaan rerata apoptosis (TUNEL) kelas kontrol dan PEB tersebut yaitu sebesar -10,6; sehingga secara statistik dianggap ada perbedaan yang nyata. (Tabel 2)

**Tabel 2.** Hasil Uji t tidak berpasangan antara rata-rata ( $\bar{X}$ ) apoptosis (TUNEL) kelompok kontrol dan PEB

Statistik					
	n	mean	stdev	min	maks
Kontrol	10	4,7	1,82878	2	7
PEB	10	15,3	3,56059	11	21
Uji levene		Hasil uji t		Ada perbedaan yang signifikan	
F	5,629	t hitung	-8,374		
p	0,029	df	13,44		
		p	0,000		

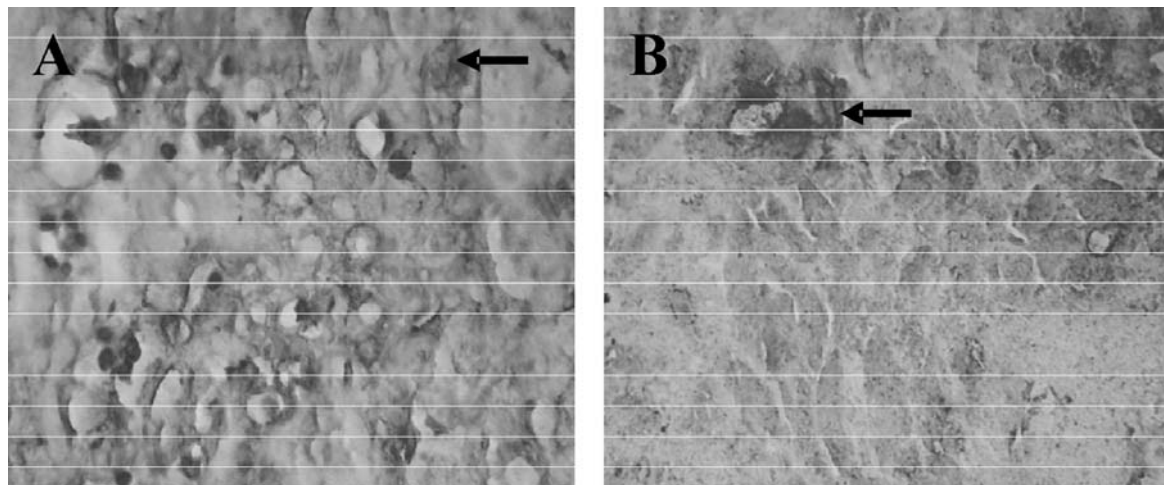


**Gambar 2.** Rerata indeks apoptosis sel-sel trofoblas jaringan plasenta kelompok normal dan kelompok preeklampsia. Terdapat menunjukkan perbedaan rerata jumlah sel-sel trofoblas yang mengalami apoptosis yang signifikan pada kelompok kontrol terhadap kelompok preeklampsia. Perbedaan notasi menunjukkan perbedaan yang signifikan, dengan nilai  $p \leq 0,000$ .

### Pengamatan Ekspresi Bcl-2

Pada penelitian ini juga diamati ekspresi Bcl2, diketahui bahwa *over* ekspresi dari Bcl-2 dilaporkan akan melindungi sel-sel limfosit dari kejadian apoptosis, dengan memperhatikan fungsi Bcl-2, peneliti mengamati ekspresi Bcl-2 pada preeklampsia. Pada penelitian ini, dengan metode imunohistokimia telah berhasil dilakukan pemulasan terhadap ekspresi Bcl-2 intraseluler pada sel-sel trofoblas plasenta dengan kasus preeklampsia (Gambar 3).

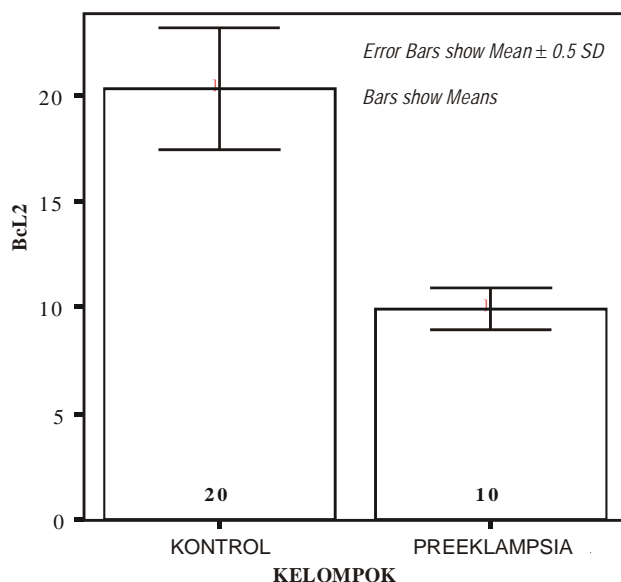
Dengan menggunakan perhitungan menurut Soini (1998) dan Pizem & Cor (2003) yang dimodifikasi<sup>4,13</sup> untuk menghitung jumlah ekspresi Bcl-2 diketahui bahwa terjadi penurunan yang signifikan ekspresi Bcl-2 intraseluler sel-sel trofoblas pada preeklampsia. Dari hasil analisis menunjukkan perbedaan yang signifikan ekspresi Bcl-2 intraseluler sel-sel trofoblas kelompok normal (rerata  $20,30 \pm 5,774$ ) dibandingkan kelompok plasenta preeklampsia (rerata  $9,90 \pm 1,912$ ). Rerata hasil perhitungan Bcl-2 pada kelompok normal dan preeklampsia menunjukkan perbedaan rerata ekspresi Bcl-2 intraseluler sel-sel trofoblas yang signifikan pada kelompok kontrol terhadap kelompok preeklampsia. Perbedaan notasi menunjukkan perbedaan yang signifikan, dengan nilai  $p \leq 0,000$ . (Tabel 5)



**Gambar 3.** Ekspresi Bcl-2 intraseluler sel-sel trofoblas jaringan plasenta yang dipulas dengan anti Bcl-2 (imunohistokimia). Tampak bahwa terjadi penurunan ekspresi Bcl-2 pada sel-sel trofoblas yang mengalami preeklampsia. Ekspresi Bcl-2 akan berwarna coklat pada sitoplasma sel (panah warna hitam). A. Plasenta normal B. Plasenta preeklampsia

**Tabel 3.** Rerata hasil perhitungan Bcl-2 pada kelompok normal dan preeklampsia

Kelompok	Rerata	± SD	Notasi
Normal	20,30	5,774	a
Preeklampsia	9,90	1,912	b



**Gambar 4.** Rerata ekspresi Bcl-2 intraseluler sel-sel trofoblas jaringan plasenta kelompok normal dan kelompok preeklampsia. Terdapat perbedaan rerata ekspresi Bcl-2 intraseluler sel-sel trofoblas yang signifikan pada kelompok kontrol terhadap kelompok preeklampsia. Perbedaan notasi menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai  $p \leq 0,000$ .

Berdasarkan uji statistik dengan uji t, menunjukkan bahwa nilai signifikansi ( $p$ ) dari Bcl-2 antara kelompok PEB dan kontrol sebesar 0.000 yang lebih kecil dari  $\alpha$  0,05 dengan nilai  $-t$  hitung (5,407). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada Bcl-2 dari kelompok PEB dan kelompok kontrol. Hal ini disebabkan oleh adanya perbedaan rata-rata Bcl-2 kelas kontrol dan PEB tersebut yaitu sebesar 10,4, sehingga secara statistik dianggap ada perbedaan yang nyata. (Tabel 3)

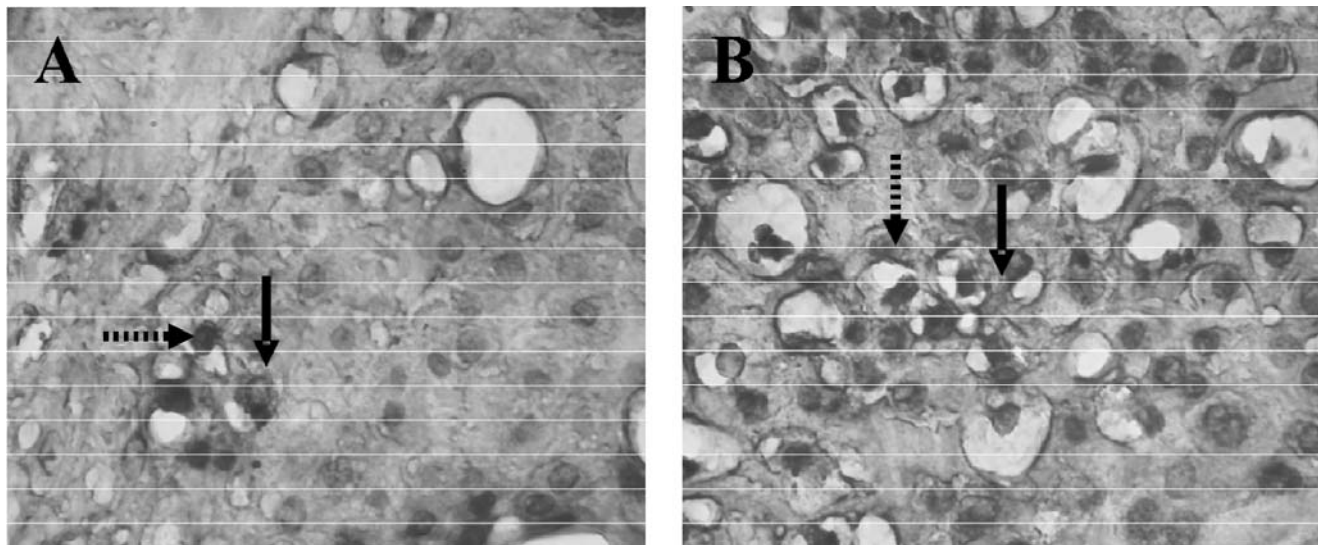
**Tabel 4.** Hasil uji t tidak berpasangan antara rata-rata ( $\bar{X}$ ) Bcl-2 kelompok kontrol dan PEB

Statistik					
	n	mean	stdev	min	maks
Kontrol	10	20,3	5,77446	11	31
PEB	10	9,9	1,91195	6	13
Uji levene		Hasil uji t		Ada perbedaan yang signifikan	
F	6,059	t hitung	5,407		
p	0,024	df	10,95		
		p	0,000		

### Pengamatan ekspresi p53

Peningkatan indeks apoptosis pada plasenta dengan kasus preeklampsia memberikan dugaan bahwa terjadi peningkatan aktivasi dari p53. Pada penelitian ini, dengan metode imunohistokimia telah berhasil dilakukan pemulasan terhadap ekspresi dan aktivasi p53 pada jaringan trofoblas plasenta dengan kasus





**Gambar 5.** Ekspresi dan aktivasi p53 sel-sel trofoblas jaringan plasenta yang dipulas menggunakan anti p53 (imunohistokimia). Tampak bahwa terjadi peningkatan ekspresi p53 pada sel-sel trofoblas yang mengalami preeklampsia. Ekspresi p53 akan berwarna coklat pada sitoplasma sel (panah warna hitam) sedang aktivasi p53 ditunjukkan warna coklat pada inti sel (panah putus-putus). A. Plasenta normal B. Plasenta preeklampsia

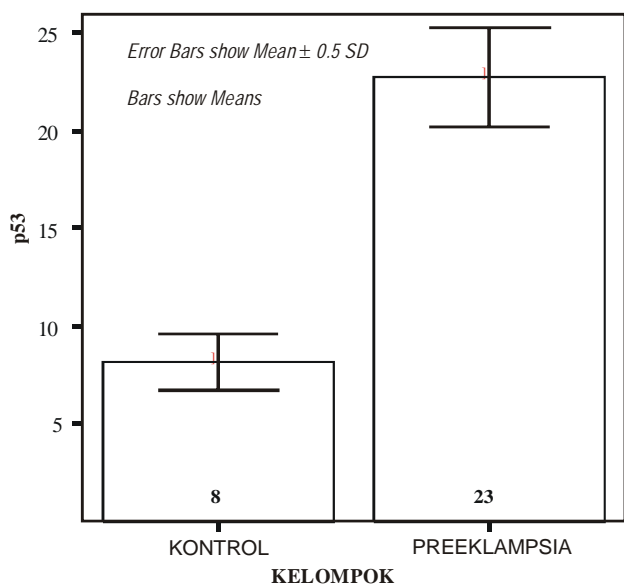
preeklampsia (Gambar 5). Tampak bahwa, dengan menggunakan perhitungan menurut Soini (1998) dan Pizem & Cor (2003) yang dimodifikasi<sup>4,13</sup> untuk menghitung jumlah ekspresi dan aktivasi p53, diketahui bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ekspresi maupun aktivasi p53 kelompok plasenta normal ( $8,20 \pm 2,898$ ) dibandingkan dengan kelompok plasenta preeklampsia ( $22,70 \pm 4,990$ ) dengan signifikansi  $p \leq 0,000$ .

Rerata hasil perhitungan ekspresi aktivasi p53 pada kelompok normal dan preeklampsia menunjukkan perbedaan rerata ekspresi maupun aktivasi jumlah sel-sel trofoblas yang signifikan pada kelompok kontrol terhadap kelompok preeklampsia. Perbedaan notasi menunjukkan perbedaan yang signifikan, dengan nilai  $p \leq 0,000$ .

**Tabel 5.** Rerata hasil perhitungan ekspresi aktivasi p53 pada kelompok normal dan preeklampsia

Kelompok	Rerata	$\pm$ SD	Notasi
Normal	8,20	2,898	a
Preeklampsia	22,70	4,990	b

Hasil pengujian dengan uji t menunjukkan bahwa, nilai signifikansi ( $p$ ) dari p53 antara kelompok PEB dan kontrol sebesar 0,000 yang lebih kecil dari alpha 0,05 dengan nilai  $-t$  hitung (-7,946). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa terdapat perbe-



**Gambar 6.** Rerata ekspresi maupun aktivasi p53 sel-sel trofoblas jaringan plasenta kelompok normal dan kelompok preeklampsia. Terdapat perbedaan rerata ekspresi maupun aktivasi jumlah sel-sel trofoblas yang signifikan pada kelompok kontrol terhadap kelompok preeklampsia. Perbedaan notasi menunjukkan perbedaan yang signifikan, dengan nilai  $p < 0,000$ .

daan yang signifikan pada p53 dari kelompok PEB dan kelompok kontrol. Hal ini disebabkan oleh adanya perbedaan rata-rata p53 kelas kontrol dan PEB tersebut yaitu sebesar (-14,5), sehingga secara statistik dianggap ada perbedaan yang nyata.

PEB dan kontrol sebesar 0,000 yang lebih kecil dari alpha 0,05 dengan nilai -t hitung (-7,946). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada p53 dari kelompok PEB dan kelompok kontrol. Hal ini disebabkan oleh adanya perbedaan rata-rata p53 kelas kontrol dan PEB tersebut yaitu sebesar (-14,5), sehingga secara statistik dianggap ada perbedaan yang nyata.

**Tabel 6.** Hasil uji t tidak berpasangan antara rata-rata ( $\bar{X}$ ) p53 kelompok kontrol dan PEB

		Statistik				
	n	mean	stdev	min	maks	
Kontrol	10	8,2	2,89828	3	12	
PEB	10	22,7	4,98999	11	28	
Uji levene		Hasil uji t		Ada perbedaan yang signifikan		
F	1,159	t hitung	-7,046			
p	0,296	df	18			
		p	0,000			

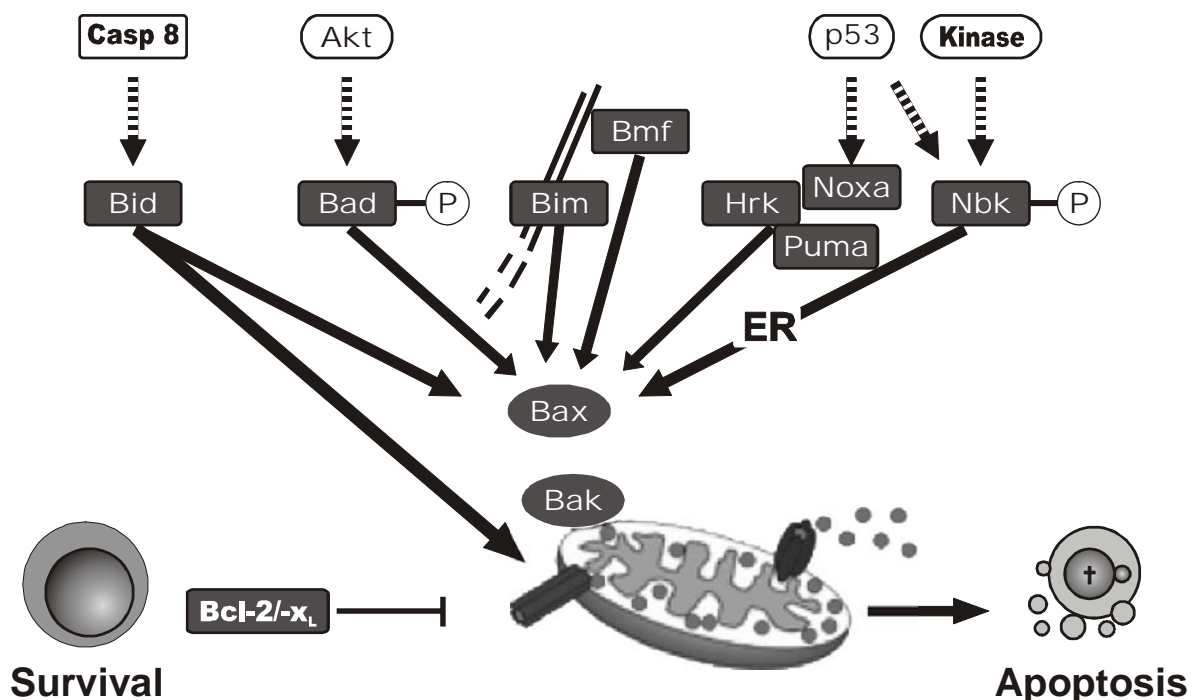
## DISKUSI

Peningkatan apoptosis sel-sel trofoblas preeklampsia melibatkan peran mitokondria dalam meregulasi proses apoptosis. Diketahui bahwa, jalur apoptosis,

menurut Husada (2004)<sup>13</sup>, salah satunya melibatkan protein (reseptor) CD95 atau reseptor Fas (yang tergabung dalam *TNF Receptor family*) beserta Fas ligand, yang disebut sebagai TRAIL (*TNF Receptor Apoptosis Inducing Ligand*) yang membentuk jalur menuju apoptosis dan disebut sebagai *Extrinsic pathway* atau juga *Death Receptor Pathway*. Hal ini dibedakan dengan *Mitochondrial pathway* yang disebut juga sebagai *Intrinsic Pathway*.

Peningkatan ekspresi Bax intraseluler sel-sel trofoblas preeklampsia mendukung hal tersebut, bahwa jalur apoptosis melibatkan Bax (*Bcl-2 family*) merupakan protein proapoptosis yang akan berinteraksi dengan Bcl-xl atau berikatan secara langsung dengan membran luar mitokondria sehingga terjadinya pelepasan sitokrom-c, yang akan bersama dengan Apaf-1, procaspase-9 dan ATP membentuk apoptosome, yang akan mengaktifkan jalur apoptosis internal (Green and Reed, 1998).<sup>13</sup>

Secara jelas, Husada (2004)<sup>13</sup> memaparkan bahwa Bax yang diaktifkan oleh Bid menyebabkan terjadinya *Permeability Transition Pore* (PTP) pada membran luar mitokondria menjadi terbuka sehingga sitokrom-c bisa bocor dengan akibat apoptosis. Protein (Bcl-2 dan Bcl-xl) mampu mencegah terjadinya PTP ini. Sehingga tampak bahwa peningkatan ekspresi Bax pada proses apoptosis oleh karena preeklampsia, memberikan bukti keterlibatan mitokondria dalam kejadian apoptosis tersebut.



**Gambar 7.** Jalur Apoptosis melalui Mitokondria yang dimediasi oleh Bax (*Bcl-2 family*), bahwa Bax diaktifkan oleh protein Bid maupun Bad yang diaktifkan melalui jalur eksternal (*death receptor*) melalui caspase-8. Bax berinteraksi dengan membran luar mitokondria, yang akan menyebabkan pelepasan sitokrom-c yang akhirnya akan menyebabkan apoptosis sel (Daniel, 2004).

**Tabel 7.** Hasil uji korelasi antara ekspresi p53, Bcl-2 dan apoptosis sel-sel trofoblas plasenta dengan preeklampsia berat.

		<i>Correlation</i>			
		<i>BAX</i>	<i>p53</i>	<i>Apoptosis</i>	<i>Bcl-2</i>
BAX	<i>Pearson Correlation</i>	1	0,726*	0,724*	-0,799*
	<i>Sig. (2-tailed)</i>		0,000	0,000	0,000
	<i>N</i>	20	20	20	20
p53	<i>Pearson Correlation</i>	0,726*	1	0,874*	-0,651*
	<i>Sig. (2-tailed)</i>	0,000		0,000	0,002
	<i>N</i>	20	20	20	20
Apoptosis	<i>Pearson Correlation</i>	0,724*	0,874*	1	-0,663*
	<i>Sig. (2-tailed)</i>	0,000	0,000		0,001
	<i>N</i>	20	20	20	20
Bcl-2	<i>Pearson Correlation</i>	-0,799*	-0,651*	-0,663*	1
	<i>Sig. (2-tailed)</i>	0,000	0,002	0,001	
	<i>N</i>	20	20	20	20

Dengan menggunakan metode yang sama, dengan mengamati ekspresi Bcl-2, sebagai antiapoptotik, memberikan gambaran yang mendukung bahwa telah terjadi penurunan yang signifikan ekspresi Bcl-2 intraseluler sel-sel trofoblas jaringan plasenta preeklampsia. Protein (Bax) dapat bekerja dengan membuka saluran  $\text{Ca}^{2+}$  atau menghambat Bcl-2 sehingga membuat efek anti-apoptotik Bcl-2 terhalang, demikian pula Bad menghambat Bcl-xl. Kerusakan DNA terjadi karena beberapa faktor, antara lain: AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) yang terletak di intermembran mitokondria, bocor keluar oleh karena pecahnya membran mitokondria kemudian memasuki nukleus dan menimbulkan kerusakan, aktifnya berbagai endonuclease, di antaranya Endonuclease G, PARP (Poly-ADP Ribose Polimerase) memicu kematian sel via apoptosis dengan menempuh berbagai jalur (*pathways*) (Husada, 2004).<sup>13</sup>

Daniel (2004), mengilustrasikan bahwa jalur apoptosis melalui mitokondria yang dimediasi oleh Bax (Bcl-2 *family*), yang mana bahwa Bax diaktivasi oleh protein Bid maupun Bad. Bad diaktivasi melalui jalur eksternal (*death receptor*) melalui caspase-8. Bax berinteraksi dengan membran luar mitokondria, yang akan menyebabkan pelepasan sitokrom-c yang akhirnya akan menyebabkan apoptosis sel.

Berdasarkan gambaran tersebut, menunjukkan keterlibatan protein 53 kDa (p53). Bahwa p53 terlibat dalam kejadian apoptosis sudah dilaporkan pada penelitian terdahulu (Riawan, 2004).<sup>13</sup> Dengan analisis jalur keterkaitan p53 terhadap ek-

spresi Bax (proapoptotic protein) yang dilakukan memberikan hasil bahwa, terdapat hubungan positif peningkatan ekspresi p53 diikuti peningkatan ekspresi intraseluler Bax.

Korelasi antara ekspresi p53, Bcl-2 dan apoptosis sel-sel trofoblas plasenta dengan preeklampsia berat.

Hasil uji korelasi antara ekspresi p53, Bcl-2 dan apoptosis sel-sel trofoblas plasenta dengan preeklampsia berat. Menunjukkan hubungan positif (korelasi positif) yang signifikan antara peningkatan ekspresi dari p53 dengan ekspresi Bcl-2 intraseluler dan juga apoptosis sel-sel trofoblas plasenta dengan preeklampsia. Sejalan dengan penemuan Daniel (2004)<sup>12</sup>, bahwa p53 akan mengaktivasi Bax melalui jalur signal transduksi beberapa molekul, yang akan menyebabkan terjadinya *Permeability Transition Pore* (PTP) pada membran luar mitokondria menjadi terbuka sehingga sitokrom-c bisa bocor dengan akibat apoptosis.

## KESIMPULAN

Pada penelitian ini didapatkan jumlah sel trofoblas penderita preeklampsia berat yang mengekspresikan p53, dan indeks apoptosisnya lebih tinggi dibandingkan dengan kehamilan normal. Sedangkan jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan Bcl-2 lebih tinggi pada kehamilan normal dari pada penderita preeklampsia berat yang mengalami proses apoptosis. Berdasarkan hasil analisis statistik de-



ngan menggunakan uji T didapatkan adanya perbedaan yang bermakna pada ekspresi p53 dan Bcl-2 serta indeks apoptosis antara kedua kelompok ( $p < 0,05$ ).

Dengan demikian dapat ditarik suatu kesimpulan bahwa, jumlah sel trofoblas pada jaringan trofoblas kehamilan preeklampsia/eklampsia lebih tinggi, apabila dibandingkan dengan kehamilan normal.

## RUJUKAN

1. Levi R, MD. The Role of Apoptosis in Preeclampsia; IMAJ, 2005; 7: 178-81
2. Wibowo B, Rachimhadhi T. Preeklampsia dan eklampsia. Ilmu Kebidanan. Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo, 1999: 281-301
3. Buku Laporan Tahunan Instalasi IRNA 3, RSU Dr. Saiful Anwar Malang, 2007
4. Keman K. Hubungan antara Interleukin-10 (IL-10) dan Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) pada jaringan Trofoblas dan Sel Sitotrofoblas; dengan Kegagalan Proses Diferensiasi, Invasi, dan Pseudovaskulogenesis Trofoblas pada Patogenesis Preeklampsia; Maj Obstet Ginekolog Indones; 31-2, April 2007: 92-115
5. Redman CWG, Sargent IL, 2001. The pathogenesis of preeclampsia. Gynecol Obstet Fertil. 29, 518-22
6. Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Placental apoptosis in normal human pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 1997; 177: 57-65
7. Huppertz B, Hunt JS. Trophoblast apoptosis and placental development a workshop report. Placenta 2000; 21: 74-6
8. Levy R, Nelson DM. To be, or not to be, that is the question. Apoptosis in human trophoblast. Placenta 2000; 21: 1-13
9. Austgulen R, Isaksen CV, Chedwick L, Romundstad P, Vatten L, Craven C. Pre-eclampsia: associated with increased syncytial apoptosis when the infant is small-for-gestational-age. Journal of Reproductive Immunology 61 (2004) 39-50
10. Beausejour A, Bibeau K, Lavoie J-C, St-Louis J, Brochu M. Placental oxidative stress in a rat model of preeclamptic. Placenta 28 (2007) 52-8
11. DiFederico E, Genbacev O, Fisher SJ. Pre-eclampsia is associated with widespread apoptosis in Cytotrophoblasts within the uterine wall. Am J Reprod Immunol 1999; 155: 293-301
12. Levy R, Smith SD, Yusuf K, Huettner PC, Kraus FT, Sadovsky Y, Nelson DM. Trophoblast apoptosis from pregnancies complicated by fetal growth restriction is associated with enhanced p53 expression. Am J Obstet Gynecol 2002; 186: 1056-61
13. Riawan W, Keman K, Wibowati S, Ali M. Peningkatan insiden apoptosis pada sel-sel trofoblas jaringan plasenta preeklampsia berkaitan dengan peningkatan ekspresi p53 dan penurunan PPAR teraktivasi. Jurnal Kedokteran Brauwijaya Vol. XX No. 3, Desember 2004, 136-41